

## 【総説】

# 霊長類に特異的な神経細胞の「生」と「死」 —20年間のサル研究から—

## Neuronal death and birth specific for the primate hippocampus

金沢大学大学院医学系研究科  
再生脳外科学

山 嶋 哲 盛

### はじめに

高等霊長類であるニホンザルは核酸やアミノ酸の配列がヒトと95%もの相同性を示すことから、そこから得られた実験データはヒトの病気のメカニズムを解明し、新規の治療法を開発する上で直接役立つものと考えられている。私はニホンザルを用いて一過性全脳完全虚血モデルを確立し、過去20年間、神経細胞の生と死のメカニズムに関して研究してきた。脳虚血負荷後、海馬CA1領域 (図1) の錐体ニューロンに遅発性に生じる細胞死のメカニズムとして、1998年に「カルバインーカテプシン仮説」を提唱した<sup>1)</sup>。この仮説は、ここ10年の間にNatureをはじめ、Nat Rev Neurosci, EMBO Report, J Cell Biol, J Clin Invest, J Neurosciなどの国際ジャーナルに引用されてきた。一方、同じ虚血サルモデルを用いて、CA1領域に隣接する歯状回 (図1) に生じるニューロン新生に関して検索し、霊長類とげっ歯類との間にはかなりの差異があることを明らかにしてきた。また、歯状回に新生するニューロンにダウン症候群と密接に関係する細胞接着因子であるDSCAM<sup>2)</sup>、および多価不飽和脂肪酸をリガンドとして情報伝達を行うGPR40<sup>3,4)</sup>を発見した。本論文では、400頭近くのニホンザルを用いたこれまでの研究で明らかにし得た神経細胞の生と死のメカニズムに関して、概説したい。

### I 神経細胞死

#### I-1: サルの一過性全脳完全虚血手術

サルの一過性全脳完全虚血手術は私が独自に考案した手法<sup>5)</sup>により行った。すなわち、体重5-10Kgのニホンザルを用い、マスクにより麻酔導入し気管内送管した後、自発呼吸下でフローセンガスと笑気ガスによる全身麻酔を行う。人工呼吸器を用いると、縦隔を開放した後胸膜の膨満が激しくなり手術器具の尖端で損傷しやすくなるので、手術は自発呼吸下で行うのが望ましい。

胸部の正中において胸骨の上縁より長さ5cm程度の皮膚切開を行い、胸骨全部と左右の付着部の第I～III肋骨先端をリューエル鉗子とケリソン鉗子により少しずつ丁寧に削り落とした後、縦隔の正中線に沿って胸膜を損傷しないように進入し、ちょうど第II肋骨の真下付近で周囲組織より無名動脈と左鎖骨下動脈とを慎重に剥離し確保する。両血管に糸をかけた上でブルドッグ・クランプにて血流遮断した後、20分後にクランプをはずし血流を再開する。血流を遮断すると、10～30秒以内に自発呼吸は停止するので、10分間程度バッグにて補助呼吸を施していると、弱いながらも次第に自発呼吸が出てくる。レーザードップラー局所脳血流計を用いると、動脈クランプ中の脳血流が0.5ml/100g brain/min以下になっていることが確認できる。クランプ直後に両側の瞳孔は散瞳し、脳波は60秒以内に平坦にな

る。慣れてくると、局所脳血流や脳波を特にモニターしなくても、自発呼吸の停止と散瞳、および数十mmHgの血圧上昇を確認するだけで、血管のクランプ操作によって完全脳虚血となっていることを推定し得る。閉創後に麻酔ガスを切ると多少の個体差はあるが、サルは5～30分で覚醒し、2～3時間後には自力で立ち上がり経口摂取を始める。

#### I-2: 「カルバインーカテプシン仮説」(図2)

砂ネズミを対象とした1982年の研究報告以来、一過性脳虚血の後5-7日目に海馬CA1領域の錐体細胞が神経細胞死をきたすことは、げっ歯類から霊長類に至るまで広く知られていたが、その分子メカニズムに関しては不明な点が多かった<sup>6)</sup>。当時、脳虚血によってシナプス間に多量のグルタミン酸が放出されること、CA1ニューロンに顕著なCa<sup>2+</sup>動員が生じること、およびそれによってカルバインの活性化が起きることの3点に関しては国際的なコンセンサスがあったが、カルバインの下流のカスケードは完全にベールに覆われていた。しかも、'90年代の後半にはアポトーシスがこの遅発性神経細胞死の原因であるとする論文が多数発表され、国際的な趨勢となっていた。

ニホンザルを用いた研究で、私はまず20分間の脳虚血後5日目にCA1錐体細胞に生じる神経細胞死においてアポトーシスのカスケードが動いているか否かを検索した。その結果、ウエスタンブロットではカスパーゼ3の活性化は虚血3時間後にピークとなり、RT-PCRではCAD/ICADの活性化は虚血1日目にピークであった。しかも、免疫組織化学的にはCA1錐体細胞において虚血3日目に胞体から核内へのCADの局在変化がみられた。しかし、光顕の観察では虚血後のCA1錐体細胞は好酸性の凝固壊死を呈し、アポトーシス小体はみられなかった。電顕的には膜の断裂像がみられ、核クロマチンは点状の凝集を示すのみであった。さらに、サザンブロットではDNAはラダー・パターンではなくスメア・パターンを呈した。つまり、CA1錐体細胞の死にはアポトーシスではなく、明らかにネクローシスであった<sup>6)</sup>。

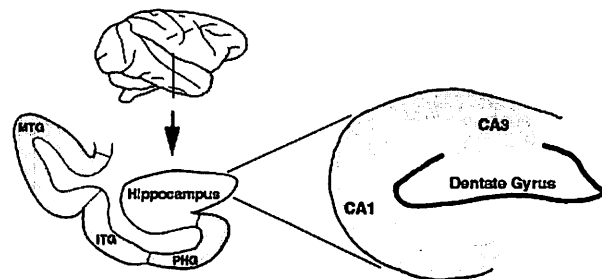


図1. サル海馬のCA1と歯状回 (Dentate Gyrus)

一方、活性型 $\mu$ -カルパインのみを認識するポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットによる検索では、虚血後のCA1領域においては虚血直後から5日目まで $\mu$ -カルパインの活性化が持続しており、虚血後3日目に活性化の程度は最大となっていた<sup>7)</sup>。活性型 $\mu$ -カルパインの免疫染色性は虚血後2日目まではリソソームに一致して粗大顆粒状に局在していたが、3日目以降は胞体全体およびニューロビルにび漫性にみられた。リソソーム膜蛋白であるlysosome-associated membrane protein-2 (LAMP-2) の免疫染色性も虚血2, 3日目ではリソソームに最も強いが、それ以降は胞体全体に散逸していた。すなわち、虚血後に活性型 $\mu$ -カルパインによってリソソーム膜が損傷され、リソソーム内の加水分解酵素であるカテプシンがリソソーム外へ放出されていることが示唆された<sup>11,15,16,18)</sup>。

以上より、高等霊長類の虚血性神経細胞死においては、カルパイン-カテプシン・カスケードの方がカスパーゼ-CAD・カスケードよりも重要な働きをなすことが明らかになった。

### I-3: ビタミンB6の神経保護効果

カルパインとカテプシンがネクローシスの原因であるなら

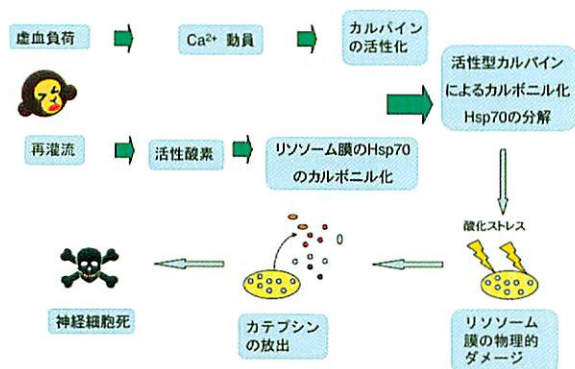


図2. 神経細胞死のメカニズム

ば、それぞれに対する特異的な阻害剤を用いることによって虚血性神経細胞死を予防することができるはずである。カルパインの阻害剤としてはロイペプチンがよく知られているが、ロイペプチンは虚血を負荷する前に投与しておかないと、神経細胞死を抑制することはできない。これは、カルパインの活性化が虚血負荷とほぼ同時に起きてしまうためである。しかし、カルパイン活性化の下流にあるカテプシンの活性化とリソソームからの放出は虚血負荷3日目以降にピークとなるため、虚血負荷の後にCA-074やE64-cなどのカテプシン阻害剤を投与してもおよそ3/4のニューロンを救うことができる<sup>11)</sup>。CA-074はカテプシンBのみを阻害するのにに対し、E64-cはカテプシンB, Lとカルパインの3者を阻害するので、当然、E64-cの方が神経細胞死を抑制する効果は大きい<sup>11)</sup>。

CA-074やE64-cは現時点では医薬品とは認められてはいないため、私はカテプシン阻害作用があるビタミンB<sub>6</sub>に注目した。リン酸ピリドキサル (pyridoxal phosphate) と塩酸ピリドキサル (pyridoxal hydrochloride) はピリジン環の4位に活性アルデヒドを持っており、これがカテプシンの活性中心にあるシステイン残基のチオール基 (-SH) にアフィニティを持つために、カテプシンBやLをin-vitroで阻害する効果があることが知られていた。そこで、虚血負荷をかける前後の10日間にわたり、15 mg/kg body weight/dayのリン酸ピリドキサルないし塩酸ピリドキサルを投与し、海馬CA-1ニューロンの神経細胞死に対する予防効果を判定した。その結果、リン酸ピリドキサルではおよそ17%の、塩酸ピリドキサルではおよそ54%のニューロンが細胞死を免れた<sup>12)</sup>。この差異はおそらく、リン酸基の存在によって分子容が大きくなるために、リン酸ピリドキサルの細胞膜透過性が塩酸ピリドキサルに比し劣っているためと解された。ともあれ、神経保護作用があるビタミンB<sub>6</sub>を常用することで、海馬の神経細胞死をある程度抑制し得ることがわかった<sup>12)</sup>。

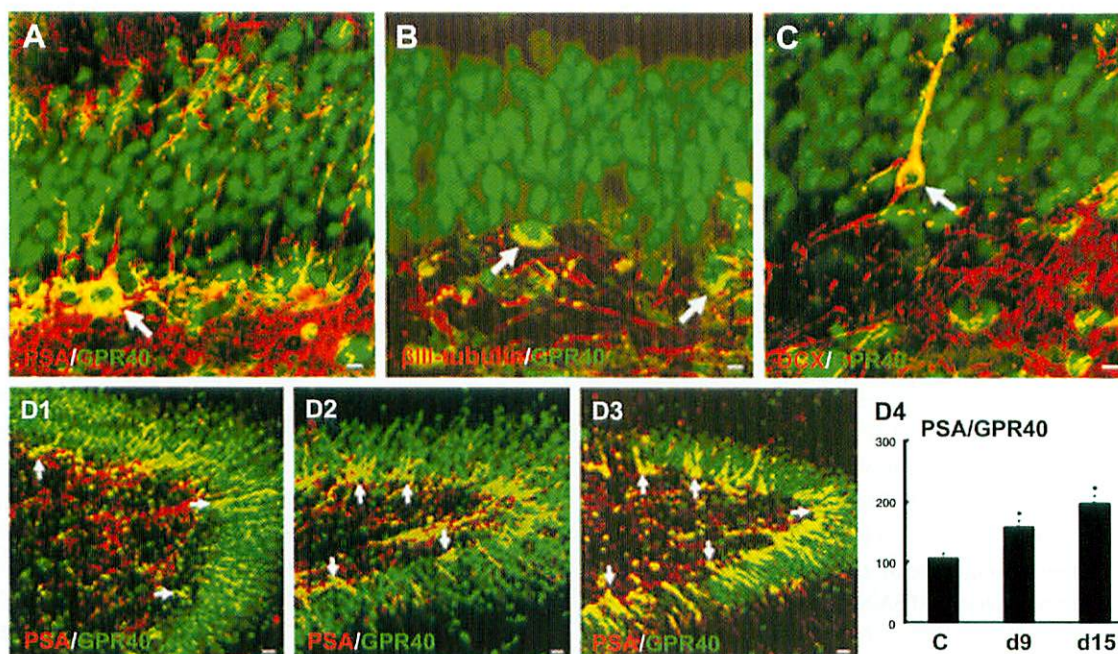


図3. GPR40の発現増加と成体海馬におけるニューロン新生

(A-C) コントロールサルの顆粒下層 (SGZ) において、PSA-NCAM (赤),  $\beta$ -III tubulin (赤), Doublecortin (DCX) (赤) 陽性の新生ニューロンは、GPR40 (緑) との共発現 (黄) を示した (矢印)。(D) コントロール (D1) に比べて、虚血後9日 (D2) と虚血後15日 (D3) には、PSA-NCAM (赤) とGPR40 (緑) とを共発現する新生ニューロン (黄) が有意に増加していた (D4)。

## II 成体脳ニューロン新生

近年、胎児脳においてと同様、成体脳においてもニューロン新生 (neurogenesis) は鳥類から高等霊長類に至るまで生じていることが明らかになった。しかも、成体脳におけるニューロン新生 (adult neurogenesis) は、学習や記憶、および情動ことについてメカニズムを知るためのみならず、種々の脳疾患を治療するための実用的な戦略を開発する目的で注目されている。成体脳においてみられる、自己複製能と多分化能とを有する神経系前駆細胞 (neural progenitor cells: NPCs) は近年世界的に注目され、げっ歯類や鳥類などを用いて多数の研究がなされているが、霊長類の脳を対象とした研究は非常に少ない<sup>10)</sup>。ヒトの脳疾患に対する画期的な治療法を開発する上で、高等霊長類にみられるニューロン新生のメカニズムを究明することは不可欠である。そこで、私は、ニューロン新生にかかわるげっ歯類と霊長類との差異を明らかにすることを目的として、ニホンザルの脳虚血モデルを用いて検索を行った。

成体脳においては、NPCsは側脳室前角の脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) と海馬歯状回の顆粒下層 (subgranular zone of dentate gyrus: SGZ) の少なくとも2箇所に存在することが知られている<sup>10)</sup>。脳再生療法を開発するためのツールとしてNPCsは現在世界的に注目されているが、霊長類の脳を対象とした研究は非常に少ない。しかし、病末期患者の剖検時に採取されたヒト脳においてBrdUに標識されたNPCsが存在することが1998年に報告されて以来、高等霊長類の脳や細胞を用いた基礎研究も散発的ではあるがなされてきた。これらの研究からは霊長類と下等哺乳類との間ではニューロン新生に関して定量的にも定性的にも、かなりの差異があることが明らかになった<sup>10)</sup>。しかも、ニューロン新生に関する種間の差異は健常時よりは脳虚血などの障害を受けた後により顕著になることがわかった。

### II-1: 高等霊長類とげっ歯類との差異

種間の差異がNPCsに内在する分子シグナルの差異によるものか、あるいはNPCsをとり巻く微小環境の差異によるものかに関しては現時点においても不明な点が多い。げっ歯類の成体脳においては近年、ニューロン新生を促進ないし抑制する多数の因子が発見されているが、これらが霊長類の脳においても同様の効果をもたらすか否かは不明である。そこで、すでに報告されているデータを検証したところ、虚血ザルのニューロン新生に関しては、げっ歯類とは対照的な以下の知見が得られた<sup>11), 12), 13)</sup>。

虚血負荷はサルの神経幹細胞を増加させるが、その増加度はげっ歯類の1/10であり、神経細胞への分化度は1/20である。げっ歯類とは異なり、サルの脳室下帯の神経幹細胞は海馬CA1において神経細胞へと分化することは皆無であった。また、サル海馬の歯状回ではPax6とEmx2およびNgn2などの転写因子は神経幹細胞の段階で発現するのみで、ニューロン前駆細胞においてはこれらの転写因子の発現はみられず、Sox1やNgn1, Dlx1/5, Olig3およびNkx2.2の発現がみられた。さらに、虚血後のサル海馬においては、神経幹細胞は脳室下帯ではなく歯状回の血管外膜に由来していた。しかも、歯状回の血管ニッチはbrain-derived neurotrophic factor (BDNF) や polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) に富んでいた。ただし、サルの脳室下帯および嗅球においても脳虚血負荷によって神経幹細胞が増加していた。

### II-2: ダウン症候群細胞接着因子 (DSCAM)

高等霊長類のニューロン新生に特異的に関与し得る遺伝子を探索するため、脳虚血負荷前後のサル海馬歯状回を用いて網羅

的な解析を行った<sup>2)</sup>。すなわち、正常および虚血後の海馬歯状回の標本を実体顕微鏡下に切り出しRNAを抽出した後、逆転写をかけて得られたcDNAを用いてfluorescent differential display-polymerase chain reactionを行った。その結果、虚血後に発現が亢進していた遺伝子は14個あったが、その中でことに細胞接着因子に着目した。すなわち、シナプスの多様性に関する分子として注目されているDown syndrome cell adhesion molecule (DSCAM)に対して2種類のポリクローナル抗体を作成して免疫染色を行った。海馬歯状回においては虚血9、15日目にDSCAM陽性細胞が著明に増加していた。DSCAM蛋白の発現増加は2種類の細胞にみられたが、一つはPSA-NCAMや $\beta$ III-tubulin陽性の新生ニューロンであり、もう一つはS100 $\beta$ 陽性のアストロサイトであった。しかも、これらのアストロサイトは新生ニューロンを取り囲み、互いに密着していた。

### II-3: ニューロン新生ニッチにおけるGPR40 (図3)

ドコサヘキサエン酸 (DHA) やアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid: PUFA) は、脳の発達や機能維持のために重要な役割を果たしているが、その作用メカニズムは十分に解明されてはいない。PUFA受容体の一つであるG-protein coupled receptor40 (GPR40) の遺伝子が脾臓と脳に発現していることは、すでに2003年に報告されていた。その後の研究で、脾臓においてはGPR40はインスリンの分泌に関与していることが明らかにされたが、脳におけるその働きはごく最近まで未知であった。

私のグループでは、脳卒中や頭部外傷の後遺症として記憶障害がみられる患者にDHAやアラキドン酸などのPUFAを服用させると、記憶力が改善することを報告した<sup>4)</sup>。PUFAには細胞膜のリニューアル以外にも何らかの機能があるに相違ないと考え、脾臓におけるインスリン分泌と2型糖尿病の発症に関わるオーファン受容体の一つであるGPR40に着目し、解析を行った。すなわち、ヒトのGPR40蛋白に対するポリクローナル抗体を作成し、ウェスタンブロットと免疫組織化学による検索を行うと、GPR40はニホンザルの中枢神経ニューロンに広範に発現していることがわかった<sup>3)</sup>。このことはPUFAが細胞膜の構成単位であるのみならず、GPR40受容体を通して細胞外シグナル伝達分子として作用していることを示唆している。ちなみに、PC12細胞に*gpr40*遺伝子を導入し、ArgusカメラでCa<sup>2+</sup>イメージングを行うと、微量のDHAに対して野生型の細胞は無反応であるのに対して、*gpr40*導入細胞はCa<sup>2+</sup>動員を示した<sup>6)</sup>。

そこで、正常および脳虚血サルを用いて、成体脳でもニューロン新生がみられる海馬におけるGPR40の発現について研究した。海馬切片を免疫蛍光染色し共焦点顕微鏡で観察したところ、歯状回SGZの新生ニューロンをはじめ、神経幹細胞および血管内皮細胞、アストロサイトがGPR40を発現していた。しかも、ウェスタンブロットでは、GPR40蛋白の発現量は虚血負荷後漸増し、ニューロン新生がピークとなる虚血第2週目に最大となった (図3)<sup>3), 4)</sup>。以上より、PUFAはGPR40を介して情報伝達を行うことによりニューロン新生を制御しているものと推定された。

成体脳にみられるニューロン新生に関しては、鳥類から霊長類に至るまで血管新生との密接な関係が示されている。サルにおいては、GPR40の発現はSGZの血管内皮細胞にも強くみられたが、GPR40はDHAなどのPUFAのシグナルを受けてまず血管新生を惹起する。その結果、これらの新生血管が神経幹細胞を局所にもたらし、これらがGPR40とPUFAの助けを借りて、自己複製をきたすのみならず、新生ニューロンへと分化してゆくものと推定された。コントロールと虚血後のSGZの両方におい



て、GPR40の発現は、ネスチン陽性の神経幹細胞においてのみならず、PSA-NCAM陽性の新生ニューロンからNeuN陽性の成熟ニューロンに至るまでみられた。しかも、ニューロン新生のピークとGPR40の発現量増加のピークとが完全に一致していた。これらの事実は、成体サル海馬においては正常および虚血後を問わず、GPR40が新生ニューロンの誕生から増殖、遊走および分化に至るまで、DHAをはじめとするPUFAがもたらすシグナルの伝達を行うことで、ニューロン新生と密接に関与していることを示唆していた<sup>9)</sup>。したがって、今後、PUFAはニューロンの膜構成単位としてだけでなく、ニューロンを活性化させるシグナル分子として見直してゆく必要がある。

#### II-4: ニューロン新生ニッチにおけるMMPの発現

亜鉛の存在下で細胞外マトリックスを再構築し情報伝達に関与するmatrix metalloproteinase (MMP) は、シナプスの形成や記憶機能に関与するとされている。しかし、成体脳におけるニューロン新生においてMMPが果たす役割については、不明な点が多い。そこで、若年のニホンザルに一過性脳虚血負荷を与えることでニューロン新生を刺激し、歯状回SGZにおけるMMP9/2の発現変化をザイモグラフィーと免疫組織化学的検索により検索した。従来の研究で、このモデルのニューロン新生は虚血後第2週目に最大となることがわかっている<sup>10)</sup>ので、虚血後15日目までを検索対象とした。

虚血前後の歯状回を用いたザイモグラフィーでは、MMP9は虚血後1~3日目および7~15日目において2相性に発現が増加するのに対し、MMP2は虚血第2週目にのみ発現の増加がみられた。免疫組織化学的観察では、MMP9/2はニューロン新生に先立ってまず血管新生を行うものと解された。すなわち、MMP9/2の発現はいずれも虚血後7日目のSGZの新生毛細血管壁において発現が最大となった。また、虚血後2週目にはMMP9/2の両者を発現する星状膠細胞が新生血管の周囲に集簇していた。さらに、MMP9/2は神経系幹細胞のマーカーであるネスチンや幼弱ニューロンのマーカーであるPSA-NCAMを発現する細胞にも陽性であった。すなわち、虚血負荷後にはMMP9/PSA-NCAMおよびMMP2/PSA-NCAM 2重陽性細胞が有意に増加し、虚血後15日目にピークとなっており、新生ニューロンの樹状突起に発現が局在していた<sup>10)</sup>。

近年、血管新生とニューロン新生との密接な関係が示唆されているが、サル海馬では虚血後7日目に血管新生が、9~15日目にニューロン新生がピークとなっていた。げっ歯類でも従来MMP9の2相性変化が報告されているが、虚血亜急性期の発現増加は免疫組織学的なデータがあるのみで、ザイモグラフィーでは証明されていない。しかも、MMP2に関しては急性期の変化しか報告されていない。霊長類ではMMP9/2の発現変化が時間と部位特異的に生じ、成体海馬におけるニューロン新生を助けている。げっ歯類と霊長類にみられたMMP発現の微妙な差異は、高等霊長類だけが持つ高次脳機能との関与を示唆するものである。

#### III 今後の展望

最近、CA1と歯状回からタンパク質を抽出して蛍光でラベルし、蛍光標識2次元ディファレンシャル・ゲル電気泳動解析システム (2D-DIGE) にて統計解析し網羅的にタンパク質の発現量の解析を行った。虚血負荷の前後に増減が認められたタンパク質については、Ettan DIGE専用のCyDye DIGE Fluorsにて染色後、スポットを高精度で切り出し、トリプシンで消化後、Zip Tipにて精製し、飛行時間型質量分析装置(TOF/MS)、デー

タベースを用いたペプチドマス・フィンガープリンティング法にて解析、同定した。以上より、私は、活性型カルパインの基質がリソソーム膜を安定化させるheat shock protein70 (Hsp70) であることに気づき (論文投稿中)、現時点においてリソソーム損傷の原因として次のようなメカニズムを推定している。

すなわち、虚血後の再灌流によって発生した活性酸素が膜リン脂質中のアラキドン酸やリノール酸などのn-6 PUFAを酸化して、4-hydroxy-2-nonenalを発生させる。これが、リソソーム膜中のHsp70をカルボニル化させるために、リソソーム膜は活性型カルパインによる蛋白分解を受けやすくなるというシナリオである。酸化ストレスによるHsp70のカルボニル化は、活性中心にある469Argに起きていることが判明した。つまり、469Argの機能異常によって基質ポケットが開くために、活性型カルパインが働きやすくなるものと推定される (図2)。

虚血ザルにおけるニューロン新生の研究は、今後、脳再生療法の研究開発に役立つものと思われる。具体的には、虚血負荷後の海馬より神経幹細胞や新生ニューロンを取り出し、これらが分化するために最も有効なPUFAの種類と量、ならびにGPR40の発現量をin-vitroでまず判定する。最近、骨髄の間葉系幹細胞がDHAの添加によってGPR40を発現しつつ、次第に新生ニューロンに分化してゆくことがわかった。そこで、脳虚血により学習能力が低下したサルに該当のPUFAを経口投与したり、GPR40を効率よく遺伝子発現させた骨髄間葉系幹細胞を頸動脈内に投与することで、海馬のニューロン新生を促進し、虚血負荷によって一旦低下した記憶機能を回復させることができないかを現在、検討中である。

#### おわりに

サルを用いた研究はハーベストはそれなりに大きいとは言うものの、実験手技の困難さとリスク、および倫理面でのハードルやランニングコストが非常に高いことなどを考慮すると、誰にでもそうたやすくできるものではない。動物の確保と輸送、飼育、書類申請に関わる労力のみならず、全身麻酔と外科手術の手技、それ相当の研究費などが必要である。私が20年もの長期間にわたりサル研究を続けてこられたのはたまたま、いくつかの幸運に恵まれたおかげである。

まず、1990年代は実験材料のサルは、北陸の山間部において田畑を荒らす有害動物として捕獲されたものをほとんどただ同然で譲り受けることができた。農家の座敷に入り込んで昼寝している乳児のそばを駆け抜けたり、屋敷の屋根瓦の上で虎視眈々と食べ物を狙い、集団で現れて畑の収穫物をごっそりさらってゆくサルがおとりで次々に捕獲された。当初は、野生動物の捕獲や検疫、飼育などに関する法令が現在ほどは厳しくはなかったため、町役場の方たちも猟師による銃殺を嫌い医学部への移譲にむしろ協力的だった。したがって、関連論文がないために科学研究費が獲得できなかった時分でも、十分な数の予備実験をこなすことができ、ネズミを用いて報告されていた従来のデータを検証し得た。

次に、西道隆臣博士の作られた活性型のカルパインを認識する抗体がヒトのエピトープに基づいて作成されたものであったために、サルにおいて十分なcross-reactionがみられ、カルパインの活性化をウエスタンブロットと免疫組織化学で直接的に証明し得たのが幸いした。多くの生化学者が行っていたように、フォドリン (スペクトリン) の分解産物をみて、カルパインの活性化を間接的に推定するという方法では、活性型カルパインがリソソーム膜に移動するのを可視化し得なかった。活性型カル

ルバインがサイトゾールからリソソーム膜へとダイナミックに移動することを発見したことが何よりも大きかった。

しかも、10年かかって「カルパイン-カテプシン仮説」を提唱した後、次の研究テーマを模索していた時にバルナ医科大学で医学生時代に研究奨励賞をとったほど実験好きなトンチェフ・アントン君が共同研究のため5年間留学して来てくれたことも大きかった。彼は鳥類やげっ歯類と同様に虚血サルモデルでもadult neurogenesisが亢進しているはずだとの信念を持って実験を続け、次々と見事な成果を出して私をニューロン新生という新しい世界に誘ってくれた。文字通り、一粒で2度おいしい海馬の標本は、神経細胞の生と死とを平行して解析できる貴重なサンプルとなった。

さらに、「カルパイン-カテプシン仮説」によって文部科学省の目標達成型脳科学研究制度(研究代表者:川合史史・自治医大名誉教授)の潤沢な研究資金を獲得することが出来た上に、実験動物研究施設の早川純一郎・浅野雅秀教授をはじめ金沢大学の関係各位の御指導と御協力とにより、サルの研究拠点を本学に構築することができたことが有り難かった。In-vivoの実験では培養細胞や遺伝子改変マウスを用いるように、分子カスケードの全貌を明らかにすることは至難ではあるが、今後も、関係各位の御指導と御協力とに感謝しつつ、初心を忘れることなく、金沢大学から引き続きsomething NEWを発信してゆければと願っている。

## 謝 辞

本研究の遂行に際しては、多くの先生(敬称は略)にご指導を頂いた。すなわち、一過性全脳虚血手術法の考案とサル実験法に関して小野武年(富山医大)、アーガスカメラによるCa<sup>2+</sup>イメージングと研究指針に関して吉岡 亨(早稲田大学)、工藤佳久(東京薬科大学)および瀧田正寿(産業技術総合研究所)、PETを用いた神経細胞死の可視化に関して塚田秀夫(浜松ホトニクス中央研究所)、抗ヒト活性型カルパイン抗体の供与に関して西道正臣(理化学研究所)および大海 忍(東京大学)、抗カテプシン抗体とカテプシン阻害剤の供与に関して木南英紀(順天堂大学)、ビタミンB6のカテプシン阻害機構に関して勝沼信彦(徳島文理大)、DSCAMを見つけたdifferential displayに関して向田直史(本学がん研究所)、小胞体ストレスに関して小川 智(本医学系研究科)、サルの学習機能評価に関して朝倉正雄(東京未来大学)、ニューロン新生におけるMMPの役割に関して佐藤 博(本学がん研究所)、GPR40に関する研究指導に関して吉本谷博、井関尚一および若山友彦(本医学系研究科)、Hsp70の関与を見つけたプロテオミクス解析に関して及川伸二(三重大学)、骨髄間葉系幹細胞の分離と培養に関して池原 進(関西医大)、ならびに成体脳ニューロン新生の研究指針に関して岡野栄之(慶應大学)および澤本和延(名古屋大)の各先生である。

臨床医である私が、競争が激しい最先端研究分野において曲がりなりにも一定の成果を出し得たのは、これらの基礎科学者の御指導と御鞭撻の賜物に他ならず、この紙面を借りて深甚の謝意を表させていただきます。

また、実験を直接行った脳神経外科学教室の博士課程大学院生(山本祐一、光田幸彦、赤池秀一、山野 潤、多田吾行、土屋勝裕、良田雅彦、塚田利幸)、再生脳外科学教室の留医医師(Tonchev AB, Popivanova BK, Kaplamadzhiev DM, Boneva NB, Vachkov IH, Zhao L, Wang XD, Guo J, Tao B, Ma D, Lu L)、ボスドクの小谷 進、および修士課程大学院生(高橋紀子、薬科省吾、森 佳美、佐原俊矢)の諸君に心から感謝します。さらに、これらの初心者に生化学的手法をトレーニングして頂いた渡邊雅彦(北海道大学)、米田幸雄、中西義信(本学薬学部)、藤井千文(信州大学)、中谷雅明(本医学系研究科)、樋口善博(鈴鹿医療科学大学)、比舍弘子および足立 靖(関西医大)の諸先生に深謝いたします。

## 文 献

1) Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T, Kominami E. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a

novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *Eur J Neurosci* 10: 1723-1733, 1998.

2) Yamashima T, Popivanova BK, Guo J, Kotani S, Wakayama T, Iseki S, Sawamoto K, Okano H, Fujii C, Mukaida N, Tonchev AB. Implication of "Down syndrome cell adhesion molecule" in the hippocampal neurogenesis of ischemic monkeys. *Hippocampus*. 16: 924-935, 2006.

3) Ma D, Lu L, Boneva NB, Warashina S, Kaplamadzhiev DB, Mori Y, Nakaya MA, Kikuchi M, Tonchev AB, Okano H, Yamashima T. Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the neurogenic niche of adult monkey hippocampus. *Hippocampus*. 18: 326-333, 2008.

4) Yamashima T. A putative link of PUFA, GPR40 and adult-born hippocampal neurons for memory. *Prog Neurobiol*. 84: 105-115, 2008. Review.

5) Yamashima T, Saido TC, Takita M, Miyazawa A, Yamano J, Miyakawa A, Nishijyo H, Yamashita J, Kawashima S, Ono T, Yoshioka T. Transient brain ischaemia provokes Ca<sup>2+</sup>, PIP<sub>2</sub> and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys. *Eur J Neurosci* 8: 1932-1944, 1996.

6) Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* 62: 273-295, 2000. Review.

7) Yamashima T, Tonchev AB, Tsukada T, Saido TC, Imajoh-Ohmi S, Momoi T, Kominami E. Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. *Hippocampus* 13: 791-800, 2003.

8) Yamashima T. Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* 36: 285-293, 2004. Review.

9) Yamashima T, Zhao L, Wang XD, Tsukada T, Tonchev AB. Neuroprotective effects of pyridoxal phosphate and pyridoxal against ischemia in monkeys. *Nutr Neurosci*. 4: 389-397, 2001.

10) Yamashima T, Tonchev AB, Yukie M. Adult hippocampal neurogenesis in rodents and primates: endogenous, enhanced, and engrafted. *Rev Neurosci* 18: 67-82, 2007. Review.

11) Tonchev AB, Yamashima T, Chaldakov GN. Distribution and phenotype of proliferating cells in the forebrain of adult macaque monkeys after transient global cerebral ischemia. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 191: 1-106, 2007. Review.

12) Tonchev AB, Yamashima T. "Transcribing" postischemic neurogenesis: a tale revealing hopes of adult brain repair. *J Mol Med* 85: 539-542, 2007.

13) Yamashima T, Tonchev AB, Borlongan CV. Differential response to ischemia in adjacent hippocampal sectors: neuronal death in CA1 versus neurogenesis in dentate gyrus. *Biotechnol J* 2: 596-607, 2007. Review.

14) Lu L, Tonchev AB, Kaplamadzhiev DB, Boneva NB, Mori Y, Sahara S, Ma D, Nakaya MA, Kikuchi M, Yamashima T. Expression of matrix metalloproteinases in the neurogenic niche of the adult monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus*. 18: 1074-1084, 2008.